

研究报告

假蜜环菌醛酮还原酶 AtAKR297 克隆表达及对 AFB₁ 转化作用谢春芳¹, 李菲菲^{2,3,4}, 蒋天扬^{2,3,4}, 姚冬生^{*2,3,4}¹ 暨南大学 生物科学与技术系, 广东 广州 510632² 暨南大学 生物医药研究院, 广东 广州 510632³ 广东省生物工程药物重点实验室, 广东 广州 510632⁴ 教育部基因组药物工程研究中心, 广东 广州 510632

谢春芳, 李菲菲, 蒋天扬, 姚冬生. 假蜜环菌醛酮还原酶 AtAKR297 克隆表达及对 AFB₁ 转化作用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2203-2215.

XIE Chunfang, LI Feifei, JIANG Tianyang, YAO Dongsheng. *Armillariella tabescens* aldo-keto reductase AtAKR297: cloning, expression, and application in reduction of aflatoxin B₁[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2203-2215.

摘要: 【背景】黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)是迄今为止发现的毒性最强的生物毒素之一, 它通过污染花生、玉米、棉花和辣椒等不同作物, 对人类和动物健康造成严重威胁。由于醛酮还原酶能够将多种醛酮类物质还原为毒性更小的醇类物质从而发挥解毒作用, 所以推测醛酮还原酶可能具有转化 AFB₁ 的可能。【目的】克隆了假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)中的醛酮还原酶 AtAKR297, 以研究醛酮还原酶 AtAKR297 对 AFB₁ 的转化作用。【方法】使用 TRIzol 法提取假蜜环菌的总 RNA, 根据蛋白质谱获取的肽段信息及 cDNA 末端快速克隆(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术获取醛酮还原酶 AtAKR297 基因全长序列; 构建醛酮还原酶 AtAKR297 的表达系统, 用亲和层析对蛋白进行纯化, 并进行酶活力检测及酶学性质分析。在 pH 8.0 缓冲体系中, 将醛酮还原酶 AtAKR297 与 AFB₁ 反应 12 h, 用高效液相色谱仪对残余的 AFB₁ 进行检测, 并用高分辨率液相色谱-质谱仪对转化产物进行鉴定。【结果】成功克隆出假蜜环菌的全长 AtAKR297 基因, 基因长度为 894 bp, 共编码 297 个氨基酸; pET28a(+)-AtAKR297 质粒转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)宿主菌中, 实现诱导表达并对酶学性质进行分析。AtAKR297 的最适反应温度为 20 °C, 最适反应 pH 值为 8.0; 在 15–50 °C 具有较好的稳定性, 孵育 30 min 酶活可维持 60% 以上; 在 pH 5.0–8.0 具有较好的稳定性, 孵育 2 h 酶活可维持 75% 以上。醛酮还原酶 AtAKR297 与 AFB₁ 的相互作用质谱鉴定结果显示 AtAKR297 能作用于 AFB₁ (依赖 NADPH), 将 AFB₁ 还原为毒性降低的黄曲霉毒醇(aflatoxicol, AFL), 该产物分子式为 C₁₇H₁₄O₆。【结论】成功从假蜜环菌中克隆出醛酮还原酶基因 AtAKR297,

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103003).

*Corresponding author. E-mail: tdsyao@jnu.edu.cn

Received: 2024-08-09; Accepted: 2024-10-19; Published online: 2024-11-21

并构建了具有醛酮还原酶活性的 *AtAKR297* 的原核表达系统。*AtAKR297* 在 NADPH 的存在下能将 AFB₁ 还原为毒性降低的 AFL。

关键词: 醛酮还原酶; 黄曲霉毒素; 转化产物

***Armillariella tabescens* aldo-keto reductase *AtAKR297*: cloning, expression, and application in reduction of aflatoxin B₁**

XIE Chunfang¹, LI Feifei^{2,3,4}, JIANG Tianyang^{2,3,4}, YAO Dongsheng^{*2,3,4}

1 Department of Biological Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2 Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

4 Genomic Medicine Engineering Research Center of Ministry of Education, Guangzhou 510632, Guangdong, China

Abstract: [Background] Aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the most potent biotoxins discovered to date, posing threats to the health of humans and animals by contaminating various crops such as peanut, maize, cotton, and chili pepper. Given that aldo-keto reductases can detoxify a range of aldehydes and ketones by reducing them to less toxic alcohols, it is hypothesized that these enzymes may have the potential to convert AFB₁. **[Objective]** To investigate the role of the aldo-keto reductase *AtAKR297* cloned from *Armillariella tabescens* in the conversion of AFB₁. **[Methods]** The TRIzol method was employed to extract the total RNA from *A. tabescens*, and the full-length sequence of the *AtAKR297* gene was obtained based on the peptide information from proteomic analysis and RACE. An expression system for *AtAKR297* was constructed, and the expressed protein was purified by affinity chromatography. The enzyme activity and kinetic properties were then analyzed. *AtAKR297* was reacted with AFB₁ in a buffer system at pH 8.0 for 12 h. The residual AFB₁ was determined by HPLC, and the conversion products were identified by high-resolution LC-MS. **[Results]** The full-length *AtAKR297* gene from *A. tabescens* was successfully cloned, with a length of 894 bp, encoding 297 amino acid residues. The recombinant plasmid pET28a(+)-*AtAKR297* was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) cells for induced expression of the target protein. The enzymatic properties of the expressed protein were then characterized. *AtAKR297* showed the highest activity at 20 °C and pH 8.0. It showcased good thermal stability at 15–50 °C, with the relative activity maintained above 60% after incubation for 30 min. In addition, *AtAKR297* demonstrated good stability at pH 5.0–8.0, with the relative activity maintained above 75% after incubation for 2 h. The MS results of the interaction between *AtAKR297* and AFB₁ showed that *AtAKR297* reduced AFB₁ (dependent on NADPH) to less toxic aflatoxicol (AFL, C₁₇H₁₄O₆). **[Conclusion]** The aldo-keto reductase gene *AtAKR297* was successfully cloned from *A. tabescens*, and a prokaryotic expression system with aldo-keto reductase activity was constructed. *AtAKR297* can reduce AFB₁ to less toxic AFL in the presence of NADPH.

Keywords: aldo-keto reductase; aflatoxin; conversion product

真菌毒素是由不同真菌如曲霉菌(*Aspergillus*)、链格孢菌(*Alternaria*)、镰刀菌(*Fusarium*)和青霉菌(*Penicillium*)等产生的次级代谢产物。研究表明,全球 60%–80%的作物受到真菌毒素感染^[1]。黄曲霉毒素是一种真菌毒素,黄曲霉毒素主要由黄曲霉和寄生曲霉产生,它通过污染花生、玉米、棉花和辣椒等不同作物,对人类和动物健康造成严重威胁,导致全球经济损失数十亿美元。目前已报道有 20 种黄曲霉毒素,据统计,全球约 45 亿人口受到黄曲霉毒素污染,其中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁)和黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂)最为常见且最为致命,它们在食品中的普遍存在。AFB₁的毒性最强,它能与 DNA 结合并改变其结构^[2],导致基因毒性。国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将黄曲霉毒素 B₁列为人类 1 类致癌物^[3]。我国南方地区以高温高湿气候为主,比较适合曲霉菌的生长,所以面临着严峻的农产品黄曲霉毒素污染引起的社会经济和健康问题。

黄曲霉毒素是一系列双呋喃环香豆素衍生物,AFB₁主要的毒性功能团是呋喃环中 C8=C9 双键^[4]。AFB₁微溶于水,不溶于非极性溶剂,但易溶于极性有机溶剂^[5],具有很强的热稳定性,即使在高温(>100 °C)下也不会发生热降解。这在减少食品中黄曲霉毒素污染方面构成了巨大障碍,尤其是在牛奶和乳制品中。多项研究表明,AFB₁的致癌性主要通过肝脏中细胞色素 P450 (CYP450)的激活发挥作用,在氧化酶的作用下,AFB₁被转化为活性 8,9-环氧化物^[6],该环氧化物对 DNA 具有高亲和力,形成 8,9-二氢-8-(N7-鸟苷)-9-羟基-AFB₁ (aflatoxin B₁-N7-guanine, AFB₁-N7-Gua)加合物,带电的加合物导致脱嘌呤作用,从而形成无嘌呤位点^[7]。由 AFB₁-N7-Gua 加合物引起的主要突变已被确定为原始加合物位点的 G→T 颠换^[8]。据报道,这种突变会影响

特定的碱基对位置,在 p53 肿瘤抑制基因密码子 249 的第三个碱基上,在大量关于高黄曲霉毒素暴露地区肝癌患者的流行病学研究中,这种突变非常常见^[9]。AFB₁也可直接与 RNA 或蛋白质形成加合物损伤 DNA 和 RNA,进而影响蛋白质的合成^[10]。

降解 AFB₁的方法有物理法(包括 UV 辐照、光催化、热灭活、等离子体和 Co⁶⁰伽马射线等技术破坏 AFB₁结构)、化学法(使用强氧化剂如臭氧和二氧化氯,以及有机酸和天然植物提取物,产生自由基或直接损伤 AFB₁结构中的关键化学键)及生物法(利用微生物和酶促反应,通过微生物和特定酶的作用转化 AFB₁结构)^[4]。生物法被认为是一种安全温和的降解方法,因其高效性和特异性,在保持食品质量和环保问题方面更具优势。醛酮还原酶(aldo-keto reductase, AKR)蛋白超家族分为 16 个家族,包含超过 190 个成员,这些酶能够还原诸如糖醛、酮固醇、酮前列腺素、视黄醛以及醌类等羰基底物,AKR 通常是 34–37 kDa 的单体,依赖 NAD(P)H 的氧化还原酶^[11–12]。AKR 都具有相同的蛋白质折叠特征,即三磷酸异构酶 TIM 桶或(α/β)₈-桶,桶状结构后面有环,这些环决定了底物特异性,且具有保守的辅因子结合域^[11]。其中属于 AKR7 家族的黄曲霉毒素 B₁-醛还原酶已被证实能将 AFB₁-二醛还原为 AFB₁-二醇^[13–14]。

本实验室前期研究发现了一株能降解 AFB₁的假蜜环菌(*Armillariella tabescens*),并从中分离了黄曲霉毒素氧化酶^[15]。在具有转化 AFB₁的假蜜环菌菌株胞质液的蛋白组中,发现了分子量为 35.5 kDa 的醛酮还原酶也具有转化 AFB₁的作用^[16]。本研究通过分析 *A. tabescens* 的蛋白质组,鉴定其他可能参与 AFB₁降解的 AKR,并使用液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)技术鉴定 AKR 转化 AFB₁的产物,以期有助于深入理解 *A. tabescens* 对 AFB₁的降解机制,并为开发新的 AFB₁降解策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

Armillariella tabescens、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3) 及 pET-28a(+)质粒, 实验室保存。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

马铃薯培养基(g/L): 马铃薯原汁 200.0, 葡萄糖 20.0, 七水硫酸镁 1.5, 磷酸二氢钾 3.0, 牛肉浸出粉 10.0。1 $\times$ PBS: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.90 g, KH₂PO₄ 0.24 g, 用蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 7.2–7.4。AFB₁, Romer 国际贸易(北京)有限公司; SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒, Clontech 公司; 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 和 pMD™18-T Vector Cloning Kit, TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 DNA 纯化试剂盒, NEB 公司; 质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; HisTrap™ excel 亲和柱, Cytiva 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。本研究使用的引物和基因由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物如表 1 所示。高效液相色谱仪和高分辨质谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 高速冷冻离心机, Beckman Coulter 公司; 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪(ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS), Waters 公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 蛋白纯

化仪和亲和层析柱, GE Healthcare 公司; 核酸电泳仪和蛋白电泳仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 假蜜环菌胞内粗酶液的液相色谱-串联质谱联用(Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)蛋白组分析

使用马铃薯培养基于 28 °C、180 r/min 振荡培养箱中培养获得假蜜环菌菌体, 加入 PBS 缓冲液经冰浴超声(工作 5 s, 间隔 10 s) 30 min 进行破碎, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后获取胞内液, 并进行胰蛋白酶酶解^[17], 将酶解后的肽段溶解在 0.1%甲酸水溶液中, 使用超高效液相串联高分辨质谱仪组成的液质联用系统对酶解后的肽段进行鉴定, 该鉴定由上海鹿明生物科技有限公司完成。质谱条件如下: (1) 色谱柱: Trap column, 100 μ m $\times$ 20 mm (RP-C18)、Analysis column, 75 μ m $\times$ 150 mm (RP-C18)。 (2) 流动相: A: 0.1%甲酸-水溶液; B: 0.1%甲酸-80%乙腈水溶液; 流速为 300 nL/min。 (3) 一级质谱参数: 在 m/z 200 时分辨率为 45 000, 自动增益控制目标为 10⁶, 最大注射时间 50 ms; 二级质谱参数: 分辨率为 15 000, 自动增益控制目标为 10⁵, 最大注射时间 50 ms。使用 OmicsBean (<http://www.omicsbean.cn/>)组学数据整合 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对筛选出的蛋白进行了基因本体(Gene Ontology, GO)功能注释分析并了解各蛋白的生物学功能。

表 1 *AtAKR297* 基因克隆的引物

Table 1 Primers for *AtAKR297* gene cloning

Primer	Sequence (5'→3')
<i>AtAKR297</i> -F	CCGGAATTCCGGGGAACATGGAACTTGGAAAYGGNGAYGG
<i>AtAKR297</i> -R	TTTATAGCGGCCGCATATTTAGCCTCTGTTTCATTTCTGTAGCWYTGNGC
10 $\times$ Universal Primer A Mix	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
5'RACE GSP	CGACAGAGATTGCTTGGTCAACCTGGGA
3'RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT
3'RACE GSP	ATCTCTGTCGGATTCAACCACTTT
<i>AtAKR297</i> full-length F	CTCCAGGACTTCAACGAGATGC
<i>AtAKR297</i> full-length R	CATTGTGAAGGCGGCTCGTCTC

1.4 假蜜环菌醛酮还原酶基因的克隆

使用 TRIzol 法提取假蜜环菌的总 RNA。根据蛋白质谱获取的肽段信息设计简并引物(表 1), 获取 AtAKR297 基因的中间片段。PCR 反应体系: LA Taq (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 $\times$ LA Taq Buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 8 μ L, 上、下游引物 AtAKR297-F 和 AtAKR297-R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板为假蜜环菌 RNA 反转录而成的 cDNA (50 ng/ μ L) 5 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。再根据中间片段的序列和 RACE 技术设计 5'RACE 引物和 3'RACE 引物, 通过 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒获取 AtAKR297 基因 5'端序列和 3'端序列。5'端序列 PCR 反应体系: SeqAmp DNA Polymerase 1 μ L, 2 $\times$ SeqAmp Buffer 25 μ L, 上游引物 10 $\times$ Universal Primer A Mix (0.4 μ mol/L) 5 μ L, 下游引物 5'RACE GSP (10 μ mol/L) 1 μ L, 以 5'-RACE-Ready cDNA (100 ng/ μ L) 2.5 μ L 为模板, ddH₂O 补足 50 μ L; 5'端序列 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3 min。3'端序列 PCR 反应体系: LA Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 10 $\times$ LA Taq Buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 8 μ L, 3'RACE outer primer (10 μ mol/L) 2 μ L, 3'RACE GSP (10 μ mol/L) 2 μ L, 以 3'-RACE-Ready cDNA (100 ng/ μ L) 2.5 μ L 为模板, ddH₂O 补足 50 μ L; 3'端序列 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3 min。从而拼接获得 AtAKR297 的全长基因序列, 并通过 ORFfinder 软件预测该基因的开放阅读框。

使用 ExPasy-ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam>)预测蛋白质的理化性质。使用 ESPript 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>)进行多重比对。使用 MEGA 11 软件的邻接算法(1 000 次自举复制)构建系统发育树。

1.5 醛酮还原酶基因 AtAKR297 的表达与纯化

将由上海捷瑞生物工程有限公司合成的表达质粒 pET-28a(+)-AtAKR297 转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。重组细胞在 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 0.1 mmol/L IPTG 进行诱导培养, 20 $^{\circ}$ C、150 r/min 诱导表达 20 h, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体细胞用缓冲液重悬后通过冰浴超声(工作 5 s, 间隔 10 s) 20 min 进行破碎处理, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 获得胞内粗酶液; 使用 HisTrapTM excel 亲和柱纯化重组蛋白 AtAKR297, 用含有 500 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L Na₂HPO₄-25 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 8.0)进行平衡, 用含有不同咪唑浓度(8、16、30 和 100 mmol/L)的洗脱缓冲液进行洗脱, 洗脱液脱盐后进行超滤离心浓缩蛋白质, 使用 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测目的蛋白的表达情况, 使用 Bradford 测定法确定蛋白质浓度。

1.6 酶活力检测及酶学性质分析

AtAKR297 还原酶通过对底物 4-硝基苯甲醛(4-nitrobenzaldehyde, 4-NBA)的作用产生醇类分子, 并伴随着还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)转化成氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP⁺)。反应体系包括 2 mmol/L 4-NBA、50 mmol/L Na₂HPO₄-25 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 8.0)、0.2 mmol/L NADPH 及适量的酶, 通过测量 340 nm 处紫外吸收值来检测醛酮还原酶的酶活力。

在反应体系下设置不同反应温度(15、20、30、40、50 及 60 $^{\circ}$ C)反应 5 min, 检测相关的 AtAKR297 酶活, 以确定最适反应温度。AtAKR297 的热稳定性通过在 15、20、30、40、50 及 60 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后测量剩余活性来确定, 以未进行预处理的 AtAKR297 作为对照。

在最适反应温度下使用不同 pH (pH 5.0–9.0) 的缓冲液测量酶活, 以确定最适 pH, 其中 pH 5.0–8.0 使用 50 mmol/L Na_2HPO_4 -25 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH 9.0 缓冲液使用 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液。AtAKR297 的 pH 稳定性通过在不同 pH (pH 5.0–9.0) 的缓冲液 4 °C 孵育 2 h 后测量剩余活性来确定, 以未进行预处理的 AtAKR297 作为对照, 以上均设定 3 个平行组进行试验。

1.7 AtAKR297 与 AFB₁ 相互作用及转化产物的鉴定

AtAKR297 与 AFB₁ 相互作用反应体系: 50 mmol/L Na_2HPO_4 -25 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 8.0)、100 ng/L AFB₁、0.3 mmol/L NADPH 和 0.1 mg/mL AtAKR297 酶液, 25 °C 反应 12 h, 以灭活组样品作为对照组, 使用高效液相色谱仪测量残余 AFB₁, 色谱柱为 C18 色谱柱, 流速为 0.8 mL/min, 激发波长为 365 nm, 发射波长为 425 nm, 柱温 40 °C, 进样体积为 30 μL , 流动相梯度见表 2。

使用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪进行转化产物鉴定。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱。流速为 0.3 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样体积为 1 μL , UV 检测波长为 254 nm, 流动相梯度见表 3。质谱采集模式为 ESI+MSE, 碰撞能量范围为 20–40 V, 采集范围为 50–1 000 m/z 。使用 UNIFI 软件进行差异组分分析。

表 2 AFB₁ 检测流动相梯度

Table 2 Mobile phase gradient for AFB₁ detection

Time (min)	Ultrapure water (%)	Acetonitrile (%)	Methanol (%)
0.0	70	20	10
10.0	25	75	0
10.5	0	100	0
15.5	0	100	0
16.0	70	20	10
20.0	70	20	10

2 结果与分析

2.1 假蜜环菌菌株胞内蛋白组分析

对假蜜环菌细胞内蛋白组进行分析, 共鉴定出假蜜环菌胞内粗酶液的蛋白数量 365 个, 对其中的 268 个蛋白进行分子功能分析, 发现 4 个具有醛酮还原酶活性, 包括 3 个功能肯定的醛酮还原酶和 1 个醛酮还原酶家族相关蛋白。其中质谱鉴定到 2 段肽段序列信息 (N→C): [R].NETEAGIAIR.[E]、[K].LGNGDGPISQVDQ AISVGFNHFDTAQSYR.[N]。

2.2 醛酮还原酶全长 cDNA 序列的克隆与分析

利用 TRIzol 法提取假蜜环菌的 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测显示 28S、18S 条带清晰, 并且没有 DNA 的污染, OD_{260}/OD_{280} 为 2.0, 如图 1 所示。

表 3 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪流动相梯度

Table 3 Mobile phase gradient for UPLC-Q-TOF-MS

Time (min)	Acetonitrile (%)	Ultrapure water (%)
0	25	75
4	75	25
5	25	75
10	25	75

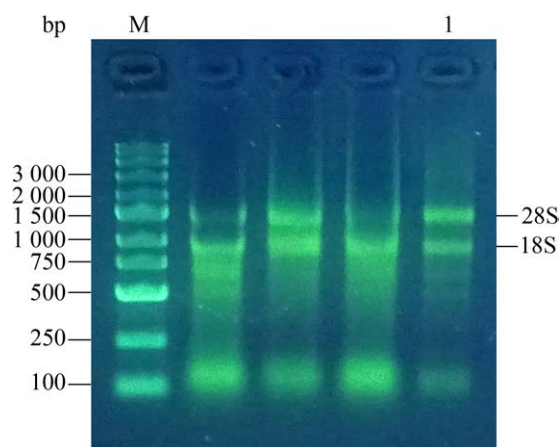


图 1 假蜜环菌 RNA 电泳图

Figure 1 Electrophoresis gel of RNA from *Armillariella tabescens*. M: DNA marker; 1: RNA.

根据质谱鉴定到的肽段序列设计简并引物扩增出 AtAKR297 基因中部片段的核酸序列(图 2A)。由测序得到的中部片段的核酸序列设计 5'RACE 的反向引物 5'RACE GSP 和 3'RACE 的正向引物 3'RACE GSP,通过 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒扩增得到大小约为 500 bp 的 5'端序列(图 2B)和约为 800 bp 的 3'端序列(图 2C) (该核酸电泳图中其他的条带为非特异性扩增),结果如图 2 所示。

将中部片段序列、5'端序列及 3'端序列拼接获得 AtAKR297 全长基因,通过 ORFfinder 预测该基因的开放阅读框。根据预测的 ORF 区的序列设计全长引物,对该基因全长 ORF 进行扩增并测序,结果显示获得的全长 AtAKR297 基因为 894 bp。使用 ExPasy-ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam>)对 AtAKR297 蛋白的理化性质进行分析,AtAKR297 编码 297 个氨基酸,预测相对分子质量约为 31.9 kDa,等电点 6.65。由于所克隆到的 AKR 无法归类到已发现的 16 个 AKR 家族中,为了表示区别,以其氨基酸数量进行标识,将其暂命名为 AtAKR297。

使用 NCBI 的 BLAST 程序进行了 AtAKR297

氨基酸序列的比对,结果显示与 AtAKR 相似性较高的是近缘物种奥氏蜜环菌 (*Armillaria solidipes*)、高卢蜜环菌(*Armillaria gallica*)、蜜环菌(*Armillaria mellea*)、北方蜜环菌(*Armillaria borealis*)的醛酮还原酶,相似性分别为 90.88%、90.54%、87.84%及 85.28%,与同属于 *A. tabescens* 的 AtAKR 具有 30.66%的相似性,序列比对结果见图 3 所示。使用 MEGA 11 软件的邻接法构建 AtAKR297 的系统发育树,如图 4 所示。

2.3 醛酮还原酶基因 AtAKR297 的异源表达与纯化结果

为了进一步探究克隆的醛酮还原酶 AtAKR297 与 AFB₁ 的相互作用,选择大肠杆菌 BL21(DE3)作为表达宿主菌株进行诱导培养,收集菌体超声破碎获得的胞内组分。使用 HisTrapTM excel 预装柱亲和层析目的蛋白,设置咪唑洗脱梯度为 8、16、30 和 100 mmol/L,并进行 SDS-PAGE 和 Western blotting,结果如图 5 和图 6 所示。100 mmol/L 洗脱组分在约 32 kDa 处具有 AtAKR297 目的蛋白(图 5)。免疫印迹结果显示,在 28–38 kDa 处有 AtAKR297 目的蛋白(图 6 箭头所示)。

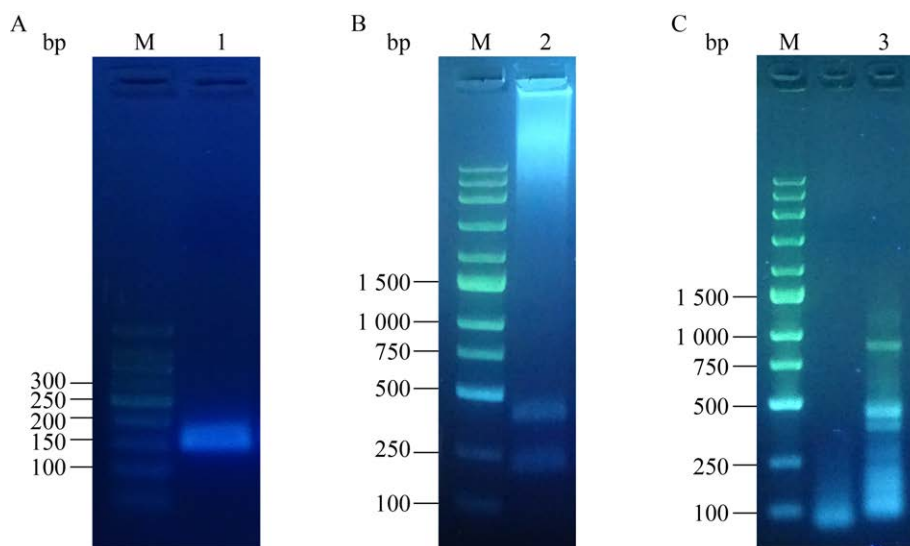


图 2 AtAKR297 基因的扩增 M: DNA marker; 1: 中部片段; 2: 5'RACE 片段; 3: 3'RACE 片段。
Figure 2 Amplification of AtAKR297 gene. M: DNA marker; 1: Middle fragment; 2: 5'RACE fragment; 3: 3'RACE fragment.

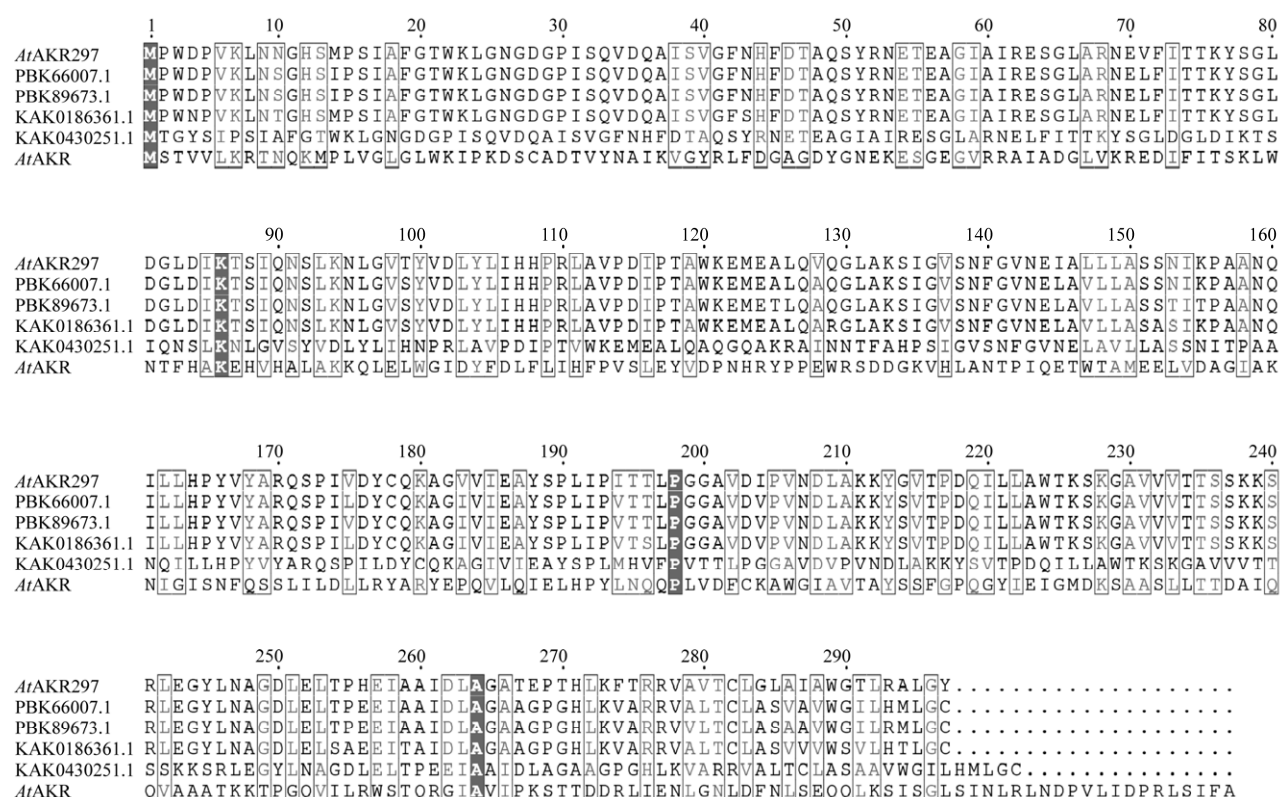


图 3 *AtAKR297* 与其他来源的醛酮还原酶的序列比对 序列名称是来自不同物种的 AKR 的登录号 (PBK66007.1 来自奥氏蜜环菌; PBK89673.1 来自高卢蜜环菌; KAK0186361.1 来自蜜环菌; KAK0430251.1 来自北方蜜环菌; *AtAKR* 来自本物种); 黑色背景的氨基酸残基为一致序列, 框内序列为高度保守序列。
Figure 3 Sequence alignment of *AtAKR297* with aldo-keto reductases from other sources. The sequence names are accession numbers of AKR from different species (PBK66007.1 from *Armillaria solidipes*; PBK89673.1 from *Armillaria gallica*; KAK0186361.1 from *Armillaria mellea*; KAK0430251.1 from *Armillaria borealis*; *AtAKR* from the current species); The amino acid residues with black backgrounds are consensus sequences, and the sequences within the boxes are highly conserved sequences.

2.4 醛酮还原酶的酶学性质分析

在 50 mmol/L Na_2HPO_4 -25 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 8.0)、0.2 mmol/L NADPH 的条件下, 以 2 mmol/L 4-NBA 为底物, 测定 *AtAKR297* 的酶活力, 结合蛋白质定量结果, 计算出 *AtAKR297* 在该实验条件下的比活力为 0.935 U/mg。酶学性质分析结果显示, *AtAKR297* 的最适反应温度为 20 °C (图 7A), 最适反应 pH 值为 8.0 (图 7B); 温度稳定性结果显示在 15–50 °C 具有较好的稳定性, 酶活可维持 60% 以上, 当孵育温度提高到 60 °C 时, 酶活急剧下降 (图 7C); pH 稳定性结果显示在 pH 5.0–8.0 具有较好的稳定性, 酶活

可维持 75% 以上 (图 7D)。

2.5 *AtAKR297* 与 AFB₁ 相互作用及产物分析

在 25 °C pH 8.0 条件下 *AtAKR297* 与 AFB₁ 反应, 使用高效液相色谱仪对体系残余的 AFB₁ 含量进行定量, 结果如图 8 所示。相较于对照组, *AtAKR297* 反应组中 AFB₁ 含量下降, 并出现了一个疑似产物峰。

制备反应产物并通过 UPLC-Q-TOF-MS 对该产物进行产物分析。在正离子模式下, 对照组和反应组均能检测到较为明显的 AFB₁ 组分, 结果如图 9A 所示, 反应组质谱图中 AFB₁ 的钠

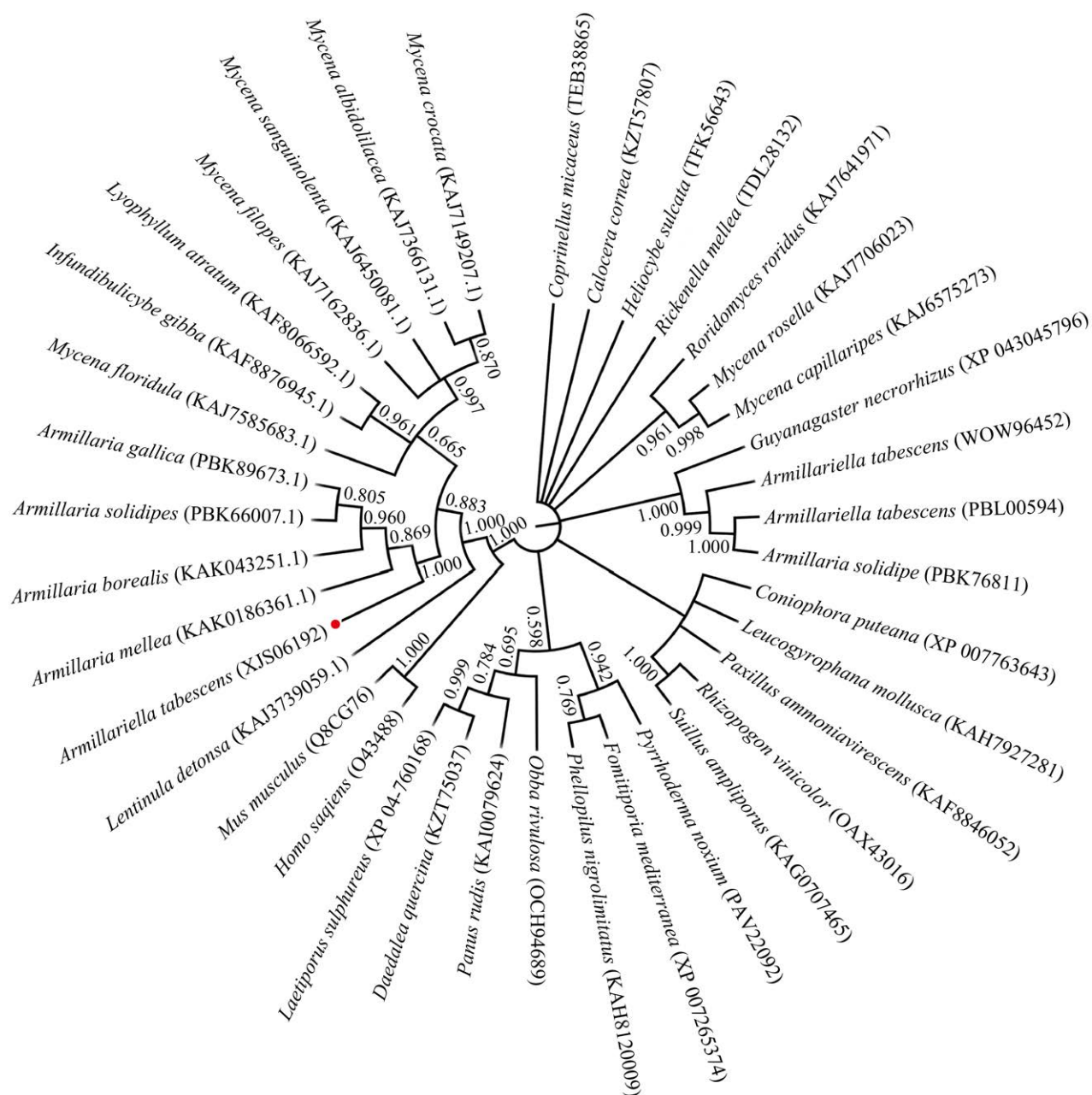


图 4 *AtAKR297* 系统发育树 每个条目为种属名；括号为该序列的 GenBank 序列号；分支上的数值表示自展值。

Figure 4 Phylogenetic tree of *AtAKR297*. Each entry is the species or genus name; The GenBank accession number of the sequence is in parentheses; The values on the branches represent bootstrap values.

加合物 $[M+Na]^+$ 为 335.053 2 m/z ，质子加合物 $[M+H]^+$ 为 313.071 2 m/z 。利用 UNIFI 软件比较差异组分，在实验组中发现疑似产物峰(保留时间为 2.79 min)。对该峰进行质谱检测，结果如

图 9B 所示，正离子模式下，该疑似产物峰的钠加合物 $[M+Na]^+$ 为 337.068 8 m/z 。同时，对照组中并未检测到此组分，提示该产物为 *AtAKR297* 作用于 AFB₁ 的产物。考虑到样品中没有 C、H、

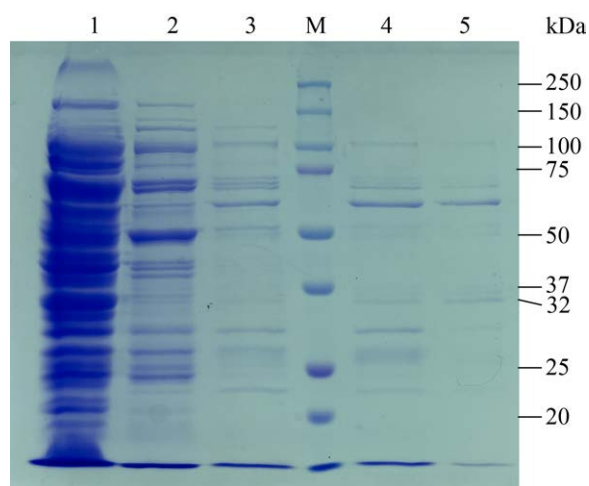


图5 *AtAKR297* 蛋白纯化洗脱峰 SDS-PAGE 图
M: Protein marker; 1: 上样样品; 2: 8 mmol/L 咪唑洗脱峰; 3: 16 mmol/L 咪唑洗脱峰; 4: 30 mmol/L 咪唑洗脱峰; 5: 100 mmol/L 咪唑洗脱峰。

Figure 5 SDS-PAGE of *AtAKR297* protein purification elution peaks. M: Protein marker; 1: Loading sample; 2: Elution peak at 8 mmol/L imidazole; 3: Elution peak at 16 mmol/L imidazole; 4: Elution peak at 30 mmol/L imidazole; 5: Elution peak at 100 mmol/L imidazole.

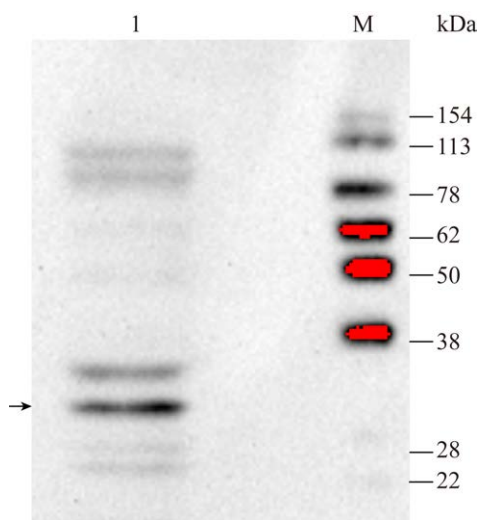


图6 *AtAKR297* 蛋白的免疫印迹 M: 免疫印迹 marker; 1: 洗脱峰(箭头所示为 *AtAKR297*)。

Figure 6 Western blotting of protein *AtAKR297*. M: Western protein marker; 1: Elution peak. The arrow highlights *AtAKR297*.

O 以外的元素, 推测该产物质荷比为 314 m/z , 其分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$, 相较于 AFB_1 ($C_{17}H_{12}O_6$) 多了 2 个 H。根据醛酮还原酶将醛基和酮基还原为羟基的催化机理, 推测 AFB_1 环戊烯酮环上 1 号碳酶促还原成了羟基, 生成代谢产物为 AFL。从人类代谢组 HMDB 数据库中获得了由 Wishart Lab 对 AFL 预测的正离子模式下碰撞能为 20 V 的 LC-MS/MS 图谱, 该预测图谱与 *AtAKR297* 转化 AFB_1 的产物图谱非常一致。这个产物与另一个从 *Armillariella tabescens* 获得的醛酮还原酶 *AtAKR* (分子量为 35.5 kDa) 对 AFB_1 转化产物相同^[16]。

3 讨论

生物体内的代谢依赖许多不同种类的酶去执行不同的催化反应, 对于毒素的代谢也是如此。为了避免毒性侵害生物体进化出相应的代谢有毒物质的酶类, 因此在不同的生物体中都能发现毒素解毒酶的存在。前期研究提示来自假蜜环菌的黄曲霉毒素氧化酶(aflatoxin oxidase, AFO)作用于 AFB_1 有可能同时涉及对底物的氧化和还原作用, 及质子和电子的传递^[18]。因此, 推测在野生菌中有可能存在某个羰基还原酶, 参与了对 AFB_1 的转化。在本研究中, 首先对假蜜环菌粗酶液的蛋白组分析, 提示其中含有 4 个醛酮还原酶, 根据蛋白质组鉴定所获得的醛酮还原酶肽段的氨基酸序列设计简并引物, 在假蜜环菌的基因组中扩增这些醛酮还原酶的基因, 但是只获得其中 2 个基因全长。我们已经对其中 1 个有高度可溶性表达的醛酮还原酶进行研究^[16], 本研究对有一定可溶性表达的 *AtAKR297* 进行研究, 结果发现 *AtAKR297* 在提供 NADPH 的条件下能够直接作用于 AFB_1 , 将 AFB_1 还原成 AFL。

AFL 是 AFB_1 还原产生的代谢产物之一, 其毒性相较于 AFB_1 低 18 倍^[19]。有研究结果显示, 将 AFB_1 转化为 AFL 可以防止形成 AFB_1 -8,9-环氧化物, 该环氧化物在转化为 AFB_1 -二氢二醇

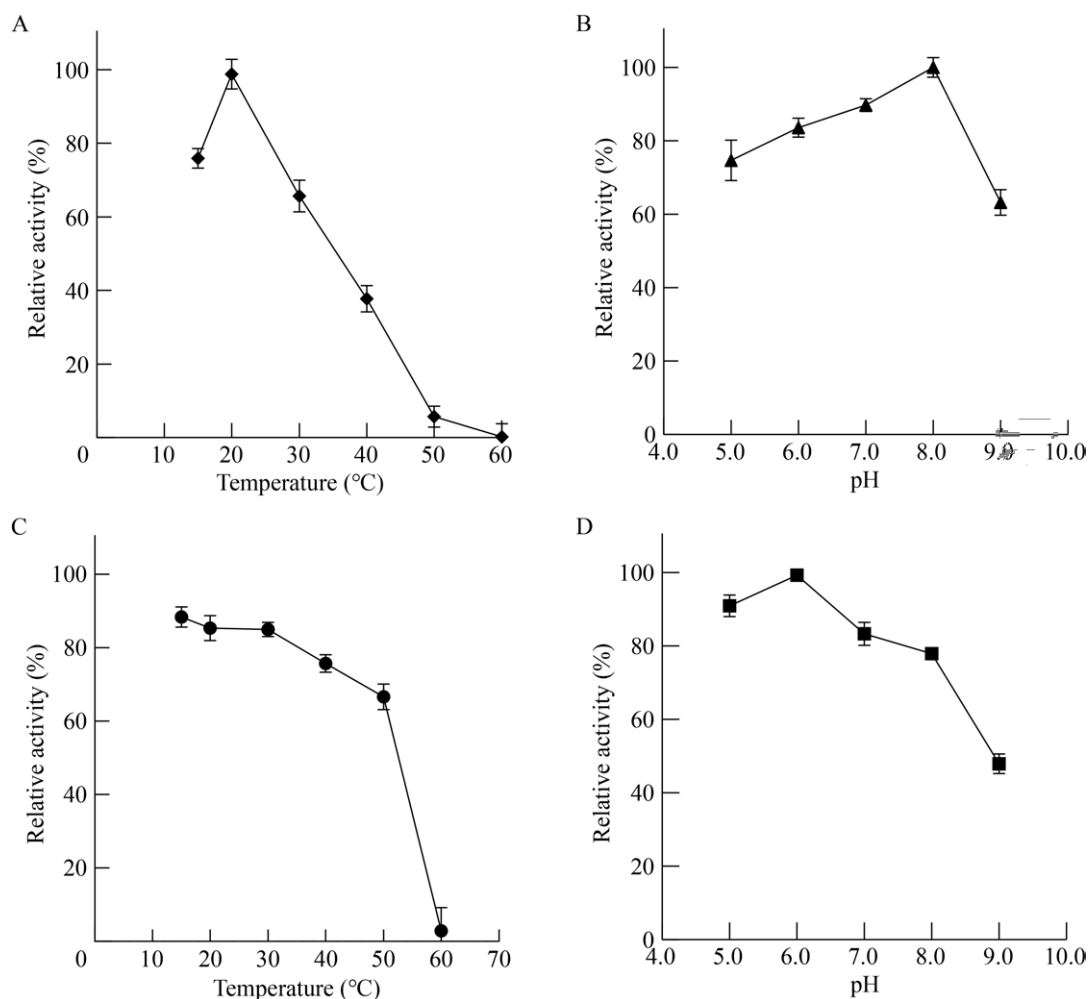


图 7 *AtAKR297* 酶学性质分析 A: 最适反应温度; B: 最适反应 pH; C: 温度稳定性测定; D: pH 稳定性测定。

Figure 7 Analysis of *AtAKR297* enzymatic properties. A: Optimum reaction temperature; B: Optimum reaction pH; C: Temperature stability determination; D: pH stability determination. Data points represent the average of triplicate measurements.

后,被认为是 AFB₁ 急性毒性效应的代谢物^[20]。研究推测,AFL 与 AFB₁ 之间存在相互转化机制。AFB₁ 可通过依赖 NADPH 的还原反应转化为 AFL,反之,AFL 也能通过依赖 NADP⁺的氧化反应转化为 AFB₁^[20]。研究结果显示,在添加 NADP⁺的情况下,该酶体系显著增强了 AFL 向 AFB₁ 的转化活性;而在添加 NADPH 的情况下,则显著增强了 AFB₁ 向 AFL 的转化活性。这表明 AFB₁ 与 AFL 之间的相互转化可能是依赖 NADPH 的酶催化作用。

4 结论

本研究通过对假蜜环菌胞内蛋白组进行分析,发现含有醛酮还原酶,通过 RACE 技术成功从假蜜环菌中克隆出醛酮还原酶 *AtAKR297*。*AtAKR297* 的 ORF 全长为 894 bp,共编码 297 个氨基酸。通过构建工程菌 pET-28a(+)-*AtAKR297*/*E. coli* BL21(DE3)表达了具有醛酮还原酶活性的 *AtAKR297*,对 *AtAKR297* 的酶学性质进行了分析。醛酮还原酶 *AtAKR297* 与 AFB₁

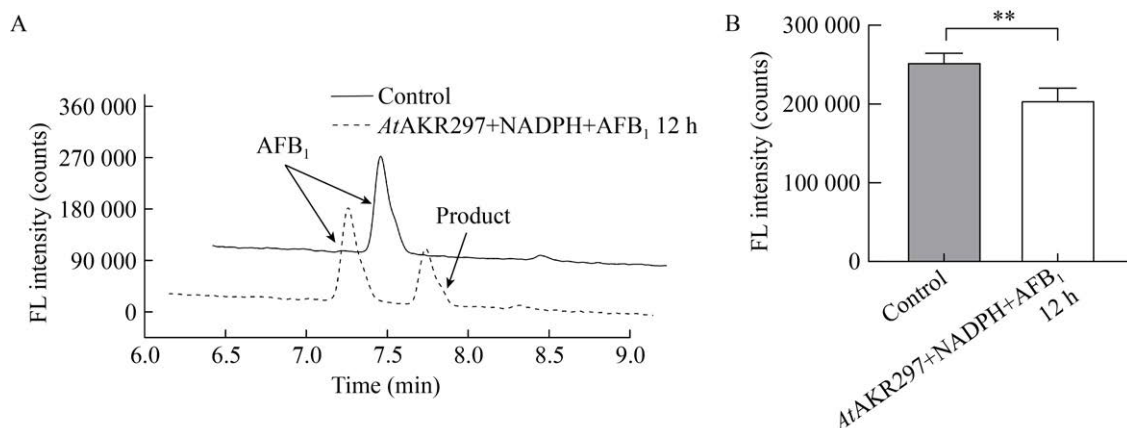


图 8 *AtAKR297* 与 AFB₁ 反应的色谱结果 A: 经过 *AtAKR297* 处理 12 h 后的 AFB₁ 色谱图(虚线), 对照组(实线), AFB₁ 及其疑似产物的荧光吸收峰分别用箭头标记; B: 经过 *AtAKR297* 处理 12 h 后的 AFB₁ 残留量(白色), 对照组(灰色); 柱状图展示了 3 次重复测量的平均值, 误差棒表示相对标准偏差(**: $P < 0.01$)。

Figure 8 Chromatographic results of *AtAKR297* reaction with AFB₁. A: Chromatogram of AFB₁ following 12 h *AtAKR297* treatment (dashed line) and control treatment (solid line). The fluorescence absorption peak of AFB₁ and suspected product were marked by arrows, respectively; B: Residual AFB₁ following 12 h *AtAKR297* treatment (white) and control treatment (gray). The histogram depicts the average of triplicate measurements and error bars represent the relative standard deviations (**: $P < 0.01$).

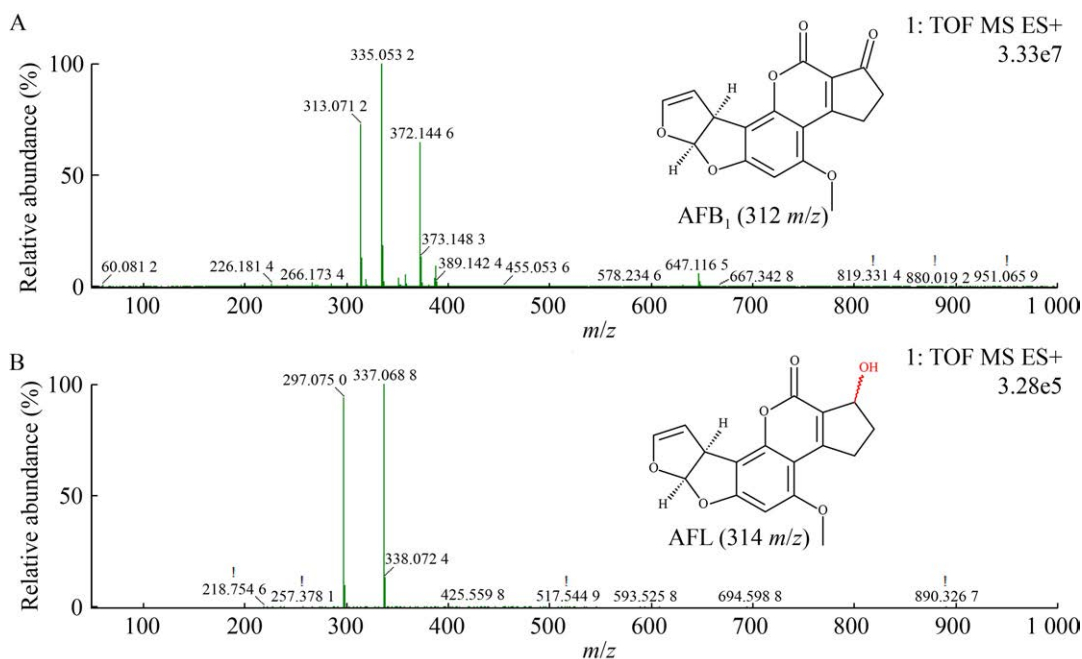


图 9 *AtAKR297* 转化 AFB₁ 的底物及产物的质谱结果 A: 底物 AFB₁ 质谱结果; B: 产物质谱结果。
Figure 9 Mass spectrometry results of the substrate and product of AFB₁ transformed by *AtAKR297*. A: Mass spectrometry results of the substrate AFB₁; B: Mass spectrometry results of the product.

相互作用的结果显示,AtAKR297 在 NADPH 存在时具有直接将 AFB₁ 还原为低毒产物 AFL 的能力。

尽管醛酮还原酶 AtAKR297 能够在一定程度上通过单一酶催化步骤降低 AFB₁ 的毒性,但转化效率低且由于 AFB₁ 和 AFL 在 NADPH 或 NADP⁺存在下具有相互转化的可能性,因此在实际应用中,仍需筛选能够将 AFB₁ 不可逆转化为无毒产物的酶,以彻底降低 AFB₁ 的毒性。

REFERENCES

- [1] ESKOLA M, KOS G, ELLIOTT CT, HAJŠLOVÁ J, MAYAR S, KRSKA R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(16): 2773-2789.
- [2] SANTINI A, RITIENI A. Aflatoxins: risk, exposure and remediation[M]//*Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*. London: InTechOpen, 2013: 343-376.
- [3] OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, GROSSE Y. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification[J]. *Mycotoxin Research*, 2017, 33(1): 65-73.
- [4] SONG CG, YANG J, WANG YD, DING G, GUO LP, QIN JC. Mechanisms and transformed products of aflatoxin B₁ degradation under multiple treatments: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(8): 2263-2275.
- [5] MARCHESE S, POLO A, ARIANO A, VELOTTO S, COSTANTINI S, SEVERINO L. Aflatoxin B₁ and M₁: biological properties and their involvement in cancer development[J]. *Toxins*, 2018, 10(6): 214.
- [6] GALVANO F, RUSSO A, CARDILE V, GALVANO G, VANELLA A, RENIS M. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B₁[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40(1): 25-31.
- [7] WILD CP, TURNER PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions[J]. *Mutagenesis*, 2002, 17(6): 471-481.
- [8] BAILEY EA, IYER RS, STONE MP, HARRIS TM, ESSIGMANN JM. Mutational properties of the primary aflatoxin B₁-DNA adduct[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(4): 1535-1539.
- [9] MACÉ K, AGUILAR F, WANG JS, VAUTRAVERS P, GÓMEZ-LECHÓN M, GONZALEZ FJ, GROOPMAN J, HARRIS CC, PFEIFER AM. Aflatoxin B₁-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(7): 1291-1297.
- [10] ZHANG YJ. Interactions of chemical carcinogens and genetic variation in hepatocellular carcinoma[J]. *World Journal of Hepatology*, 2010, 2(3): 94-102.
- [11] PENNING TM. The aldo-keto reductases (AKRs): overview[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 234: 236-246.
- [12] JEZ JM, BENNETT MJ, SCHLEGEL BP, LEWIS M, PENNING TM. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily[J]. *The Biochemical Journal*, 1997, 326(Pt 3): 625-636.
- [13] BODREDDIGARI S, JONES LK, EGNER PA, GROOPMAN JD, SUTTER CH, ROEBUCK BD, PETER GUENGERICH F, KENSLER TW, SUTTER TR. Protection against aflatoxin B₁-induced cytotoxicity by expression of the cloned aflatoxin B₁-aldehyde reductases rat AKR7A1 and human AKR7A3[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21(5): 1134-1142.
- [14] KOZMA E, BROWN E, ELLIS EM, LAPTHORN AJ. The crystal structure of rat liver akr7a1 a dimeric member of the aldo-keto reductase superfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 16285-16293.
- [15] LIU DL, YAO DS, LIANG R, MA L, CHENG WQ, GU LQ. Detoxification of aflatoxin B₁ by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1998, 36(7): 563-574.
- [16] JIANG TY, LI FF, LI F, XIE CF, LIU DL, YAO DS. Degradation of Aflatoxin B₁ by the *Armillariella tabescens*-derived aldo-keto reductase AtAKR[J]. *Food Bioscience*, 2024, 58: 103768.
- [17] WIŚNIEWSKI JR, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, MANN M. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [18] CHEN JH, LIU DL, LI SC, YAO DS. Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for sterigmatocystin detection[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 47: 119-126.
- [19] DETROY RW, HESSELTINE CW. Aflatoxicol: structure of a new transformation product of aflatoxin B₁[J]. *Canadian Journal of Biochemistry*, 1970, 48(7): 830-832.
- [20] MURCIA HW, DIAZ GJ. *In vitro* hepatic aflatoxicol production is related to a higher resistance to aflatoxin B₁ in poultry[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5508.